



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 01 661 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/04

⑳ Aktenzeichen: 198 01 661.1
㉔ Anmeldetag: 17. 1. 98
㉕ Offenlegungstag: 22. 7. 99

㉑ Anmelder:
Artus Gesellschaft für molekularbiologische
Diagnostik und Entwicklung mbH, 20459 Hamburg,
DE

㉒ Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

㉓ Erfinder:
Krupp, Guido, Dr. rer. nat., 24111 Kiel, DE; Scheinert,
Peter, Dipl.-Biol., 20257 Hamburg, DE; Söller,
Rainer, Dr. rer. nat., 28717 Bremen, DE; Spengler,
Ulrich, Dr. med., 22761 Hamburg, DE

㉖ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

DE 196 29 166 A1
DE 195 43 065 A1
DE 42 44 167 A1
WO 96 19 585 A1
WO 96 12 038 A1
WO 93 23 568 A1

Chemical Abstracts:
Vol. 125, 1996, Ref. 266832r;
Vol. 122, 1995, Ref. 124148m;
Derwent Abstracts:
Ref. 96-182313/19 zu JP 08056698-A;
Ref. 94-172775/21 zu JP 06113888-A;
Ref. 94-172785/21 zu JP 06113899-A;
Ref. 94-147008/18 zu JP 06090793-A;
Ref. 94-128675/16 zu JP 06070771-A;
Ref. 93-373608/47 zu JP 05276999-A;
Ref. 93-373605/47 zu JP 05276996-A;
Ref. 92-060511/08 zu JP 4004-899-A;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

㉗ Schnell-Detektionsverfahren für Organismen durch Längenbestimmung ausgewählter Nukleinsäurebereiche

DE 198 01 661 A 1

DE 198 01 661 A 1

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren entsprechend dem Oberbegriff des Anspruchs I.

1. Grundlagen

Als ein Beispiel wird hier die Situation bei rRNA-Genen beschrieben. Die Sequenzen von rRNAs werden bisher am häufigsten zur Identifikation von Organismen genutzt.

Im Genom von prokaryontischen und eukaryontischen Organismen sind die Operons für ribosomale RNAs (rRNAs) so organisiert, daß zunächst eine umfassende Vorläufer-rRNA transkribiert wird.

Diese Vorläufer-rRNAs enthalten folgende hier relevanten Segmente:

15 Prokaryonten: 16S rRNA – transkribierter 16S/23S rRNA Spacer – 23S rRNA – transkribierter 23S/5S rRNA Spacer – 5S rRNA

Eukaryonten: 18S rRNA – transkribierter 18S/5.8S rRNA Spacer – 5.8S rRNA – transkribierter 5.8S/28S rRNA Spacer – 28S rRNA

20 Diese generelle Organisation ist bei allen Prokaryonten (Bacteria und Archaea) und Eukaryonten vorhanden [vgl. z. B. B. Lewin (1994) GENES V, Cell Press, Cambridge, Mass., USA] mit sehr wenigen bekannten Ausnahmen, wie das Archaeon *Thermoplasma acidophilum* [Achenbach-Richter & Woese (1988) System. Appl. Microbiol. 10, 211–214] oder Bacteria wie *Helicobacter* [Tomb et al. (1997) Nature 388, 539–547].

2. Stand der Technik

2.1. Identifikation von Organismen durch artspezifische Varianz in rRNAs

Bei allen reifen und funktionellen rRNA-Species sind die Sequenzen der rRNAs zwar moderat variabel, aber die Länge der einzelnen Species ist fast völlig invariant. Entsprechend diesen Befunden sind rRNA-Sequenzen geeignet zur Identifikation von Organismen. Dies erfordert die Detektion durch Hybridisierung mit geeignet konstruierten Oligonukleotid-Sonden. Bei entsprechend hoher Keimzahl können rRNAs direkt eingesetzt werden, und mit geeignet markierten Oligonukleotid-Sonden oder in Kombination mit Signalamplifikationsverfahren wie "branched DNA" detektiert werden [Todd et al., (1994) Serodiagn. Immunother. Infect. Disease 6, 233–239]. Alternativ kann zur erhöhten Nachweisempfindlichkeit dieser Detektion zunächst eine Amplifikation der rRNAs bzw. der rRNA-Gene mit gängigen Verfahren wie PCR, NASBA oder LCR vorausgehen [Hagen-Mann & Mann (1995) Exp. Clin. Endocrinol. 103, 150–155].

35 Bei allen Detektionsverfahren basiert ein positiver Organismen-Nachweis einzig und allein auf einem positiven Hybridisierungsergebnis.

2.2. Identifikation von Organismen durch artspezifische Varianz in rRNA-Spacer-Sequenzen

40 Die Varianz in Spacer-Bereichen ist sehr viel höher, bedingt durch das Fehlen einer Funktion in den reifen rRNAs, denn die Spacer werden beim Reifen eliminiert.

Diese Varianz kann ebenfalls zur Konstruktion von species-spezifischen Oligonukleotid-Sonden genutzt werden. Die hohe Varianz bietet als wesentlichen Vorteil die erleichterte Konstruktion von spezifischen Sonden. Das Fehlen in reifen RNAs erfordert jedoch immer eine Amplifikation des relevanten Bereichs, wobei genomische DNA als Target eingesetzt wird. Beispielhaft sind die Gewinnung von Hybridisierungssonden in diesem Bereich für Clostridien [Barry et al. (1991) PCR Methods and Applications 1, 51–62], und für eine Serie anderer Bakterien, inclusive Mycobakterien [Innogenetics N.V. (1996) PCT/EP 95/02452 bzw. WO 96/00298].

2.3. Identifikation von Organismen durch artspezifische Varianz in rRNA-Spacer-Längen

50 Wie von uns [Scheinert et al. (1996) J. Microbiol. Methods 26, 103–117] und anderen [Gürtler & Stanisich (1996) Microbiology 142, 3–16] gezeigt wurde, sind die Längen der rRNA-Spacer extrem variabel. Insbesondere innerhalb einer gut definierten Gruppe, wie von uns am Beispiel von Mycoplasmen untersucht, ist allein die Länge (i) ein geeignetes Merkmal zur Zuordnung des Organismus zur Gruppe "Mycoplasmen", (ii) potentiell sogar geeignet zur Erkennung einzelner Mycoplasma-Species.

55 Zur Durchführung entsprechender Analysen wird zunächst – z. B. durch PCR – der gewählte rRNA-Spacerbereich amplifiziert, wobei genomische DNA als Template dient. Die Längenbestimmung der Amplifikate erfolgt dabei durch anschließende Gelelektrophorese (Agarosegele; Polyacrylamidgele) und Detektionsverfahren wie Färbung (z. B. Ethidiumbromid oder Silber) oder Fluoreszenzdetektion mit hochauflösenden Sequenzierautomaten. Dieses Verfahren wird jedoch nicht als eigenständiges Detektionsverfahren für die Anwesenheit eines spezifischen Organismen betrachtet, sondern nur als grobes Orientierungsmittel und kann als erster Schritt eingesetzt werden. Erst durch anschließende Hybridisierung mit einer konventionell zu definierenden Oligonukleotidsonde wird das Verfahren ausreichend spezifisch, um eine zuverlässige Identifikation des Zielorganismus zu garantieren [Barry, T. et al. (1991) PCR Methods and Applications 1, 51–62] [Uemori, T. et al. (1992) System. Appl. Microbiol. 15, 181–186].

65

3. Nachteile des Standes der Technik

Alle existierenden Verfahren zur Identifikation eines Organismus erfordern die Formulierung einer Species-spezifischen

schen Oligonukleotid-Sequenz bzw. einer entsprechenden Hybridisierungssonde.

- (i) Die Suche mit einem Zielgen (z. B. 16S rRNA) ist nicht selten erfolglos und erfordert dann den Start einer komplett neuen Suche mit einem anderen Zielgen.
- (ii) Das Verfahren ist zwar geeignet zur Formulierung von "Universal-Sonden", womit alle Vertreter einer Gattung, Familie etc. erfaßt werden (sollen). Aber die Identifikation einzelner Species innerhalb dieser Gruppen erfordert einen oft unvermeidbar hohen Aufwand bei der Durchführung. Jeder potentiell anwesende Zielorganismus muß einzeln, mit jeweils einer species-spezifischen Hybridisierungs-Sonde detektiert werden.
- (iii) Bisher unbekannte Species können nur schwer oder gar nicht erfaßt werden. Entweder werden sie nicht als neu erkannt (unveränderte Hybridisierungs-Sequenz) oder gar nicht erfaßt (veränderte Hybridisierungs-Sequenz), sogenannte "kryptische Species".

4. Aufgabe der Erfindung

Alle in Abschnitt 3 beschriebenen Nachteile können durch ein neuartiges Verfahren vermieden werden.

Im Gegensatz zu den üblichen Verfahren verzichten wir bewußt auf eine universelle Spezifität. Abhängig vom Untersuchungsmaterial und von der Fragestellung ist oft nur eine begrenzte Anzahl von Organismen-Species als relevant bekannt [Brandis et al. (1994) Lehrbuch der Med. Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York]. Ein nachgewiesener Organismus muß deshalb nur innerhalb dieser begrenzten Gruppe eindeutig zugeordnet werden. Die Erfindung ermöglicht es, gleichzeitig alle relevanten Species dieser Gruppe zu erfassen und zu identifizieren. Darüber hinaus werden auch bisher unbekannte Species-Varianten erfaßt.

5. Lösung der Aufgabe der Erfindung

Identifikation von Organismen durch Analyse von Nukleinsäure-Segmenten die universell verbreitet sind und sich durch variable Länge, Basenzusammensetzung oder Sequenz auszeichnen.

Die Erkennung von Zielorganismen beruht (i) – meist – auf der Amplifikation des gewählten Nukleinsäure-Segments durch geeignete Verfahren wie PCR. (ii) Das Nukleinsäure-Segment, evtl. auch eine Mischung, wird direkt oder nach einfacher Vorbehandlung durch ein Verfahren analysiert, das geeignet ist die innerhalb der relevanten Organismen-Gruppe bekannten Unterschiede direkt nachzuweisen.

Dieser Nachweis erfolgt durch

- (i) Detektion von Organismenspezifischen Varianzen in der Länge von Nukleinsäuresegmenten. Hier sind nur zwei universell konservierte Amplifikationsprimer erforderlich, keinerlei organismenspezifische Oligonukleotide.
- oder
- (ii) Detektion von Organismenspezifischen Varianzen in der Länge der Elongate von Oligonukleotiden (Sequenzierprimern).

Erforderlich sind hier ebenfalls zwei universell konservierte Amplifikationsprimer und zusätzlich wenige Sequenzierprimer, da auch diese zumindest moderat konserviert sind. Keinerlei organismenspezifische Oligonukleotide werden benötigt.

Zusätzlich soll es ein neuartiges Aufbereitungsverfahren erlauben, bisher nicht realisierbare, sehr große Probenvolumina zu analysieren (vgl. Abschnitt B.3). Dadurch kann die Nachweisgrenze und damit die Zuverlässigkeit des Gesamtverfahrens drastisch verbessert werden.

6. Vorteile der Erfindung

Das – innerhalb der wohldefinierten Applikation – umfassende Analyseverfahren ermöglicht die Untersuchung von Proben, die eine begrenzte Zahl verschiedener Organismen enthalten können. Ein mögliches Anwendungsbeispiel: bereits mit 12 unterschiedlichen Bakterienspecies können ca. 70% der Fälle erfaßt werden, wobei maximal 20 verschiedene Bakteriengattungen bei der Sepsis ("Blutvergiftung") relevant sind [Geerdes-Fenge et al. (1994) Chemother. J. 3, 131–143].

B. Beispielbeschreibungen zur Patentanmeldung

Die hier gezeigten Beispiele zur Zuordnung eines Organismus innerhalb einer relevanten Gruppe beruhen auf der Analyse der Längen von rRNA-Spacer bzw. daraus abgeleiteten Fragmenten oder spezifischen Elongaten von Sequenzierungsprimern.

1. Detektion durch Organismen-spezifische Länge von Nukleinsäuresegmenten

Hier können die Gesamtlängen der Segmente (nach Amplifikation, falls erforderlich), oder die Länge von geeigneten Teilabschnitten analysiert werden.

Zuordnung erfolgt durch Vergleich mit Standard-DNA-Längenmarkern und Komigration mit wohlcharakterisierten, positiven Referenz-Amplifikaten. Eine mehrfache Analyse wie sie mit bisherigen Verfahren durch verschiedene, species-spezifische Oligonukleotid-Sonden unvermeidlich ist, kann entfallen.

Beispiel 1

Die Sequenzen von Abschnitten des zur 16S rRNA benachbarten Spacer sind vollständig bekannt (EMBL Datenbank), und können die generelle Vorgehensweise illustrieren. Mit Hilfe von universell konservierten Primern an der Grenze von 16S bzw. 23S rDNA kann der Spacerbereich durch PCR amplifiziert werden [Scheinert et al. (1996) J. Microbiol. Methods 26, 103–117].

- (i) Die Gesamtlängen der erhaltenen PCR-Produkte können direkt analysiert werden.
- (ii) Zusatzinformationen ergeben sich aus der Kombination mit einer sequenzspezifischen Spaltung, z. B. wurde hier Spaltung durch ein Restriktionsenzym dargestellt.

Dabei wird ein biotinylierter PCR-Primer eingesetzt – oder ein anderes Verfahren zur selektiven Immobilisierung. Durch spezifische Immobilisierung (vor oder nach Restriktionsverdau möglich) können gezielt diese Produkte nach relativ einfacher Aufarbeitung weiter analysiert werden. Ganz nach Wunsch können diese in Form von einzelsträngiger oder doppelsträngiger DNA erhalten werden [Conrad & Krupp (1992) Nucleic Acids Res. 20, 6423–6424] [Scheinert et al. (1996) J. Microbiol. Methods 26, 103–117].

Abhängig vom gewählten Primer kann das zur 16S rDNA (bzw. 23S rDNA) benachbarte Spaltprodukt analysiert werden. Hier wurde die zur 16S rDNA benachbarte Sequenz analysiert.

Durchführung: Zur eindeutigen Identifikation eines Pathogens innerhalb dieser Gruppe wird zunächst die 16S–23S rRNA Spacerregion mit zwei hochkonservierten Primern durch PCR amplifiziert, wobei ein 16S-proximaler und ein 23S-proximaler Primer kombiniert werden. Dabei enthält einer der beiden PCR-Primer (hier der 16S-proximale Primer) ein zur Immobilisierung geeignetes Derivat, z. B. Biotin.

(i) Analyse durch elektrophoretische Verfahren

Folgende Verfahren können hier eingesetzt werden:

- (a) Standard-Polyacrylamid-Gelelektrophorese,
- (b) hochauflösende Gelelektrophorese: Sequenzierautomaten mit Plattengelformaten, bzw. der gut automatisierbaren Kapillar-Gelelektrophorese, sowie der Nachfolge-Technologie, Array-Kapillar-Gelelektrophorese mit bis zu 96-Parallelproben.

Die DNA-Probe wird in drei Aliquots aufgeteilt und folgenden Analysen unterworfen:

- Bestimmung der Gesamtlänge des Produkts
- Spaltung mit Restriktionsenzym CviJ1, Abtrennung und Bestimmung der Fragmentlänge des 16S-proximalen Spaltprodukts
- Spaltung mit Restriktionsenzym Mbo II, Abtrennung und Bestimmung der Fragmentlänge des 16S-proximalen Spaltprodukts

Diese Kombination ist erforderlich, denn z. B. nur so gelingt eine eindeutige Differenzierung zwischen *Pseudomonas aeruginosa* und *Haemophilus influenzae*.

(ii) Massenspektroskopische Analyse (MALDI-TOF)

Die so erhaltene DNA-Probe wird in zwei Aliquots aufgeteilt und folgenden Analysen unterworfen:

- Spaltung mit Restriktionsenzym CviJ1, Abtrennung und Bestimmung der Fragmentlänge des 16S-proximalen Spaltprodukts
- Spaltung mit Restriktionsenzym Mbo II, Abtrennung und Bestimmung der Fragmentlänge des 16S-proximalen Spaltprodukts

Die Analyse des Gesamtprodukts ist außerhalb des mit MALDI-TOF analysierbaren Längenbereichs. Auf Grund des sehr hohen Auflösungsvermögens genügt aber die reduzierte Kombination, z. B. gelingt eine eindeutige Differenzierung zwischen *Pseudomonas aeruginosa* (Fragmente von 14 und 9 Basen) und *Haemophilus influenzae* (Fragmente von 35 und 13 Basen). Die unmögliche Differenzierung von *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas mendocina* könnte zwar durch erhöhten Aufwand ermöglicht werden. Darauf kann aber verzichtet werden, denn die Differenzierung ist hier nicht relevant, sie hat keine medizinisch-therapeutische Bedeutung.

Tabelle 1. 16S-23S Spacer-Region zur Differenzierung der relevanten Sepsis-Erreger

Species	16S-23S rRNA Spacer Gesamtlänge (Basen)	Spaltprodukt (mit <i>Cvi</i> II) Länge (Basen)	Spaltprodukt (mit <i>Mbo</i> II) Länge (Basen)	
Gram-positive Kokken				
<i>Staphylococcus aureus</i>	303/335/370/460/550	94 / 0*	11	5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	262	155	11	10
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	250	54	0*	
<i>Enterococcus faecalis</i>	344 / 447	145 / 80	0*	15
Gram-negative Kokken				
<i>Neisseria meningitidis</i>	664	14	20	
Enterobacteriaceae: Gram-negative Stäbchen				
<i>Escherichia coli</i>	354 / 445	103 / 18	0 / 118	20
Gram-negative begeißelte Pseudomonaceae				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	470	14	10 / 9	25
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	516	16	67	
<i>Pseudomonas mendocina</i>	516	14	10	
<i>Pseudomonas syringae</i>	546	13	64	30
Pasteurellaceae: Gram-negative unbegeißelte Stäbchen				
<i>Haemophilus influenzae</i>	472/720	35	13	
<i>Haemophilus ducreyi</i>	560	45	0*	35

Kommentar zu Tabelle 1:

Mit den aufgeführten Species sind ca. 70% aller typischen Sepsis-Fälle erfasst [Geerdes-Fenge et al. (1994) Chemother. J. 3, 131-143]. Auf Grund des noch begrenzten Datensatzes können zur Zeit auch nur die Daten für diese Organismen dargestellt werden.

Einige Bakterien enthalten mehrere rRNA-Operons, mit evtl. deutlich unterschiedlichen Spacer-Segmenten, z. B. fünf unterscheidbare Varianten bei *Staphylococcus aureus*, bzw. zwei Varianten bei *Enterococcus faecalis* und *Escherichia coli* [Gürtler & Stanisich (1996) Microbiology 142, 3-16].

0*: in diesem Segment ist keine Erkennungssequenz für das betreffende Restriktionsenzym vorhanden.

2. Detektion durch Organismen-spezifische Elongation von Oligonukleotiden

Innerhalb einer ausgewählten, für die analysierte Probe relevanten Organismengruppe werden Oligonukleotide als Sequenzierungsprimer eingesetzt, die universell konserviert sind oder zumindest bei allen Zielorganismen innerhalb einer zu erfassenden Gruppe vorhanden sind. Nach Elongation mit einer Polymerase – unter Weglassung eines der vier natürlichen Nucleosidtriphosphate oder in Anwesenheit eines Terminator- Nucleosidtriphosphats (z. B. ddNTP) – entstehen Produkte mit charakteristischer Längenzunahme.

Die Organismen-spezifischen Elongationsprodukte können durch folgende Verfahren analysiert werden:

(i) Analyse durch elektrophoretische Verfahren

- (a) Standard-Polyacrylamid-Gelelektrophorese,
- (b) hochauflösende Gelelektrophorese: Sequenzierautomaten mit Plattengelformaten, bzw. der gut automatisierbaren Kapillar-Gelelektrophorese, sowie der Nachfolge-Technologie, Array-Kapillar-Gelelektrophorese mit bis zu 96-Parallelproben.

(ii) Massenspektroskopische Analyse (MALDI-TOF)

"Multiplexing" ist mit allen Verfahren möglich, das heißt die simultane Analyse der Elongationsprodukte mehrerer Sequenzierungsprimer mit unterschiedlichen Zielsequenzen. Die notwendige Unterscheidung ist möglich durch Markierung der Oligonukleotide mit:

- (i) unterschiedlich langen 5'-terminalen Zusatzsequenzen. "Talls" (einsetzbar bei allen Verfahren)
- (ii) unterschiedlichen 5'-terminale Additionen, die Laufverhalten (Verfahren a, b) oder Molekulargewicht (Verfahren

ren ii) drastisch verändern. Beispiele für solche Additionen sind Polyethylenglykol-Kette, Cholesterin-Derivate etc.
 (iii) mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Verfahren a. kombiniert mit einem Fluoreszenz-Scanner; routinemäßig für Verfahren b; prinzipiell auch möglich mit Verfahren ii, durch charakteristische Molekulargewichtswerte und das extrem hohe Auflösungsvermögen können auch sich überlagernde Elongationsmuster differenziert werden).

Beispiel 2

- 10 In Tabelle 2 wird das Verfahren am Beispiel der relevanten Sepsis-Erreger illustriert. Angegeben sind die nutzbaren charakteristischen Elongate. Auf eine detaillierte Darstellung der Multiplexing-Optionen wurde verzichtet.
 Durchführung: Zur eindeutigen Identifikation eines Pathogens innerhalb dieser Gruppe wird zunächst die relevante 16S rRNA-Region mit zwei hochkonservativen Primern durch PCR amplifiziert, hier z. B. von Position 27 (Primer 27f) bis 1492 (Primer 1492r). Dabei enthält einer der beiden PCR-Primer (hier Primer 27f) ein zur Immobilisierung geeignetes
 15 Derivat, z. B. Biotin. Der immobilisierte DNA-Strang wird dann in parallelen Reaktionen als Template für die angegebenen Sequenzierungsprimer eingesetzt.

2.1. Beispiele für hochkonservierte Sequenzierungsprimer

- 20 Hier wurden 109r1 (Sequenz: ACGYGTACKCACCCGT) und 685r1 (Sequenz: TCTACGRATTTACCCYCTAC) ausgewählt. Diese Primer sind komplementär zu 16S rRNA-Sequenzen die universell, bei allen Bakterien (nach neuer Terminologie: Bacteria und Archaea) vorhanden sind. Direkt benachbart sind derart divergente Sequenzen vorhanden, so daß die in der Tabelle 2 aufgeführten, charakteristischen sequenz-spezifischen Oligonukleotid-Elongaten erhalten werden.
 25 Dabei werden für Sequenzierungsprimer 109r1 die Nukleosidtriphosphate dGTP, dCTP, dTTP entweder allein, oder unter Zusatz von ddATP (wie in in der Tabelle 2 eingetragen) eingesetzt.
 Für Sequenzierungsprimer 685r1 werden die Nukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dTTP entweder allein, oder unter Zusatz von ddGTP (wie in in der Tabelle 2 eingetragen) eingesetzt.

2.2. Beispiele für wenig konservierte, gruppenspezifische Sequenzierungsprimer

- Falls wünschenswert oder falls zu einer notwendigen detaillierteren Differenzierung erforderlich, können auch gruppenspezifische Sequenzierungsprimer eingesetzt werden. Diese Primer sind komplementär zu 16S rRNA-Sequenzen die nur bei Vertretern einer Gruppe vorhanden sind. Elongate werden also nur dann erhalten, wenn Vertreter dieser Gruppe
 35 im Probenmaterial vorhanden sind. Zusätzlich ermöglichen direkt benachbarte, divergente Sequenzen die erforderliche Differenzierung innerhalb der Gruppe.
 Zwei unterschiedlich markierte Sequenzierungsprimer 1475^r und 1475^{r^h} wurden hier genutzt:
 1475^r (Sequenz CCCACCTTCGACGGCTAG) ist – innerhalb der Sepsis-Erreger – für die Grampositiven Kokken spezifisch.
 40 1475^{r^h} (Sequenz CATACCGTGGTAAACGCC) ist – innerhalb der Sepsis-Erreger – Haemophilus spezifisch.
 Die Mischung der beiden Sequenzierungsprimer 1475^{r^{s+h}} wird mit den Nukleosidtriphosphaten dGTP, dCTP, dTTP entweder allein, oder unter Zusatz von ddATP (wie in in der Tabelle 2 eingetragen) eingesetzt.
 Die so erhaltenen Primer-Elongate können separat analysiert werden.
 Vorteilhaft ist jedoch die bereits angeführte "Multiplex-Analyse" durch entsprechende Markierung der Sequenzierungsprimer, so daß die Produkte aller Elongationsreaktionen vereinigt und gemeinsam analysiert werden können.
 45 Problemlos ist hier die in Tabelle 1 angesprochene, eindeutige Differenzierung zwischen *Pseudomonas aeruginosa* (Elongate von 10 und 4 Basen) und *Haemophilus influenzae* (Elongate von 6 und 3 Basen).
 Der zunächst erhaltene Datensatz ermöglichte keine Unterscheidung zwischen *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*. Diese ist jedoch unverzichtbar und wird durch den zusätzlichen Einsatz des gruppenspezifischen Primers 1475^{r^s} ermöglicht. Entsprechendes gilt für die beiden *Haemophilus* Species und den Primer 1475^{r^h}.

Tabelle 2. Sequenz-spezifische Oligonukleotid-Elongate innerhalb von 16S rRNA-Regionen zur Differenzierung der relevanten Sepsis-Erreger

Species	Primer: 109r1 ddA-Terminator Länge (Basen)	Primer 685r1 ddG-Terminator Länge (Basen)	Primer 1475r ^{s+h} ddA-Terminator Länge (Basen)	
Gram-positive Kokken				
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	5	6 ^s	10
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9	5	5 ^s	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5	5	7 ^s	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	7	5	62 ^s	15
<i>Enterococcus faecalis</i>	n.d.	n.d.		
Gram-negative Kokken				
<i>Neisseria meningitidis</i>	n.d.	3		20
Enterobakterien: Gram-negative Stäbchen				
<i>Escherichia coli</i>	6	5		
<i>Enterobacter spec.</i>	13	5		25
<i>Proteus spec.</i>	13	3		
Gram-negative begeißelte Pseudomonaden				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	4		30
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12	19		
<i>Pseudomonas mendocina</i>	9	4		
<i>Pseudomonas syringae</i>	13	4		35
Pasteurellaceae: Gram-negative unbegeißelte Stäbchen				
<i>Haemophilus influenzae</i>	6	3	5 ^h	
<i>Haemophilus ducreyi</i>	6	3	7 ^h	40
Obligat anaerobe Gram-negative Stäbchen				
<i>Bacteroides spec.</i>	13 (14) ^{**}	6		45

Kommentar zu Tabelle 2

Mit den aufgeführten Species sind ca. 80% aller typischer Sepsis-Fälle erfaßt [Geerdes-Fenge et al. (1994) Chemother. J. 3. 131-143]. Im Vergleich zu Tabelle 1, können hier auf Grund des größeren Datensatzes die Daten für eine erweiterte Organismengruppe dargestellt werden, allerdings fehlen zur Zeit noch Einzelinformation (n.d.: unbekannte Daten).

(14)**: Nur ein Isolat in dieser relativ heterogenen Gattung ergibt diese Elongatlänge.

3. Neuartiges Verfahren zur Probenaufbereitung

Viele Probenmaterialien, z. B. Blut, enthalten neben den nachzuweisenden Mikroorganismen inhibitorische Substanzen sowie eine hohe Zahl menschlicher bzw. tierischer Zellen.

Nach differentieller Lyse mit geeigneten Detergentien wie Tween, Triton, CHAPS bleiben die Mikroorganismen intakt und können durch Zentrifugation "geerntet" werden. Auch Reste der Lysis-Mischung werden entfernt, wenn die Zentrifugation durch ein "Kissen" erfolgt, d. h. durch eine Lösung mit erhöhtem spez. Gewicht. Nach Entfernen der Lösung können die von Inhibitoren befreiten Mikroorganismen lysiert und weiterverarbeitet werden.

Wie in Abb. 1 skizziert, erfolgt die Lyse der im Probenmaterial vorhandenen menschlichen bzw. tierischen Zellen zunächst in einem separaten Lysisgefäß, das von einem Septum abgedichtet und dadurch vom Flüssigkissen getrennt ist. Nach Aufsetzen des Stopfens und durch Zentrifugation wird das Septum gebrochen und das Lysisgefäß dringt in das Flüssigkissen ein, wodurch der Lysispuffer nach oben gedrückt wird. Durch ihr höheres spezifisches Gewicht wandern die intakten Mikroorganismen zum Boden des Auffanggefäßes. Anschließend werden Lysispuffer und Lysisgefäß sowie das Flüssigkissen entfernt. Die isolierten Mikroorganismen sind jetzt frei von Kontaminationen verfügbar und Nukleinsäuren können nach Standardverfahren präpariert werden.

1. Umfassender Schnellnachweis von Organismen oder Organismen-Mischungen. Ausreichend ist eine Zuordnung innerhalb einer begrenzten Anzahl von Organismen-Species, die für das Probenmaterial als relevant bekannt sind. Auch ein Nachweis und eine Zuordnung als "außerhalb dieser Gruppe" ist möglich.
- 5 Abhängig vom Untersuchungsmaterial werden (i) für Mensch, Tier, oder Pflanze pathogene Organismen oder (ii) für das Untersuchungsmaterial unerwünschte Organismen nachgewiesen. Dabei kann es sich um Prokaryonten oder Eukaryonten handeln.
- Die Erkennung von Organismen erfolgt durch Analyse von Nukleinsäure-Segmenten die universell verbreitet sind und sich durch variable Länge, Basenzusammensetzung oder Sequenz auszeichnen.
- 10 Als Nukleinsäure-Segmenten können genutzt werden: (a) transkribierte Spacer, z. B. in rRNA-Transkriptionseinheiten oder Introns in mRNAs; (b) nichttranskribierte Spacer, z. B. zwischen eukaryontischen rRNA-Transkriptionseinheiten; (c) ausreichend variable und spezifisch wiedererkennbare Segmente innerhalb eines Gens, z. B. in rRNA oder RNase P RNA.
- 15 Der erste Schritt zur Erkennung von Zielorganismen beruht (meist) auf der Amplifikation des gewählten Nukleinsäure-Segments durch geeignete Verfahren wie PCR, NASBA, 3SR, SDA, LCR.
2. Das Verfahren nach Anspruch 1 ist dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäure-Segment, evtl. auch eine Mischung unterschiedlicher Segmente, direkt durch ein geeignetes Verfahren analysiert wird, das geeignet ist die innerhalb der relevanten Organismen-Gruppe bekannten Unterschiede direkt nachzuweisen.
- 20 Dieser Nachweis erfolgt durch
- (i) Detektion von Organismenspezifischen Varianzen in der Länge von Nukleinsäuresegmenten. Hier sind nur zwei universell konservierte Amplifikationsprimer erforderlich, keinerlei organismenspezifische Oligonukleotide.
- oder
- 25 (ii) Detektion von Organismenspezifischen Varianzen in der Länge der Elongate von Oligonukleotiden (Sequenzierprimern).
- Erforderlich sind hier ebenfalls zwei universell konservierte Amplifikationsprimer und zusätzlich wenige Sequenzierprimer, da auch diese zumindest moderat konserviert sind. Keinerlei organismenspezifische Oligonukleotide werden benötigt.
- 30 3. Die Aufbereitung von Probenmaterial zur Analyse nach Anspruch 1, 2 und 5 erfordert oft die gezielte Anreicherung von Mikroorganismen und Abtrennung von Inhibitoren im Probenmaterial. Unser Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß unerwünschte Zellen, wie zum Beispiel humane Zellen in Blut-, Gewebeproben (oder ähnliches in anderen, z. B. tierischen Systemen) selektiv lysiert werden, wobei die Mikroorganismen intakt bleiben. Dies erfolgt durch hypotonische Lyse, evtl. gefördert durch Zugabe von Detergentien wie Triton, Tween etc. Die intakten Zellen der Zielorganismen werden mit einer Vorrichtung (entsprechend Abb. 1) durch Zentrifugation angereichert und vom Probenmaterial getrennt.
- 35 4. Als Analyse-Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 5 sind zur Zeit einsetzbar:
- (a) Standard-Gelelektrophorese (Agarose oder Polyacrylamid),
- (b) hochauflösende Gelelektrophorese: Sequenzierautomaten mit Plattengelformaten, bzw. gut automatisierbare Kapillar-Gelelektrophorese, sowie der Nachfolge-Technologie. Array-Kapillar-Gelelektrophorese mit bis zu 96-Parallelproben,
- 40 (c) sequenz-abhängige Gelelektrophorese, wie SSCP oder Gradienten-Gelelektrophorese,
- (d) hochauflösende, gut automatisierbare Massenspektroskopie wie MALDI-TOF.
5. Detektion von Organismenspezifischen Varianzen in der Länge der Elongate von Oligonukleotiden (Sequenzierprimern). Über Anspruch 1 hinausgehend, kann dieses Verfahren auch genutzt werden, um bisher durch Hybridisierungs sonden nachgewiesene, speciesspezifische Sequenzen zu identifizieren.
- Das Vorgehen ist ähnlich wie bereits in Abschnitt B.2.2 beschrieben. Erforderlich sind zwei universell konservierte Amplifikationsprimer und zusätzlich nur ein Sequenzierprimer, der mit dem Sequenzbereich hybridisiert, der unmittelbar vor den durch die Sonde erkannten, organismenspezifischen Einzelnukleotiden lokalisiert ist. Durch die Länge der gebildeten Elongate werden die organismenspezifischen Varianten erkannt. Mit einem einzigen Sequenzierprimer können dadurch eine Vielzahl von Sequenzvarianten gleichzeitig charakterisiert und somit eine Vielzahl von verschiedenen Species identifiziert werden. Keine für die einzelnen Species spezifischen Oligonukleotide (Sonden) werden benötigt.

55

 Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

60

65

- Leerseite -

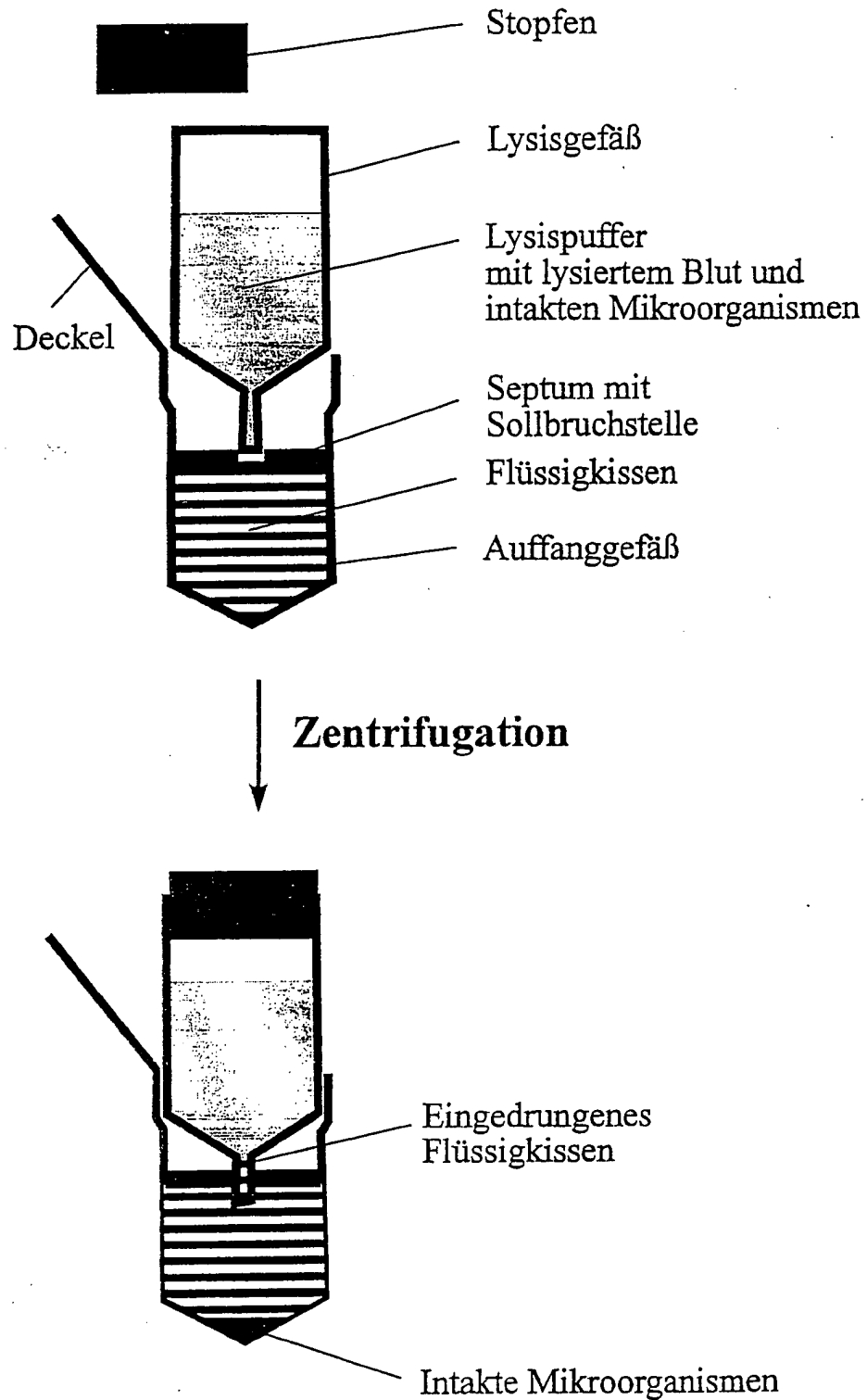


Abbildung 1